

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 60-149972

(43)Date of publication of application : 07.08.1985

(51)Int.Cl.

G01N 33/535

C12Q 1/00

(21)Application number : 59-004855

(71)Applicant : YATORON:KK

(22)Date of filing : 17.01.1984

(72)Inventor : TSUBOTA HIROYUKI
HOSHINO NOBUHIRO

(54) STABILIZATION OF ENZYME LABELLED ANTIBODY

(57)Abstract:

PURPOSE: To extremely reduce the lowering in enzymatic activity even in a long-term storage state ranging from preparation to use, by adding one or more of non-reducing sugars equal to or higher than disaccharides to an enzyme labelled antibody.

CONSTITUTION: An enzyme labelled antibody, especially pref., an enzyme labelled antibody prepared by bonding maleimide introduced peroxidase and F(ab')₂ is mixed with an adequate buffer solution with pH of 6.5W8.0 such as a phosphate buffer solution or a Tris buffer solution to prepare a solution which is, in turn, lyophilized or spray dried according to a usual method to obtain a powdery preparation. In this method, one or more of non-reducing sugars equal to or higher than disaccharides such as oligosaccharides for example, sucrose, trehalose, turanose, raffinose or melezitose, polysaccharides such as dextran and sugar alcohol is added to the enzyme labelled antibody at the time of mixing with the above mentioned buffer solution. By this method, at the time of preparation for obtaining the lyophilized product and preservation of the preparation, the good stabilization of the enzyme labelled antibody is obtained.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

CM

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭60-149972

⑬ Int.Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和60年(1985)8月7日

G 01 N 33/535

7906-2G

C 12 Q 1/00

8213-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全5頁)

⑮ 発明の名称 酵素標識抗体の安定化法

⑯ 特 願 昭59-4855

⑰ 出 願 昭59(1984)1月17日

⑱ 発 明 者 坪 田 博 幸 千葉市今井2-11-12 304

⑲ 発 明 者 星 野 信 広 船橋市西習志野4-4-8

⑳ 出 願 人 株式会社ヤトロ 東京都千代田区東神田1丁目11番4号

㉑ 代 理 人 弁理士 山下 穰平

明 細 書

1. 発明の名称

酵素標識抗体の安定化法

2. 特許請求の範囲

(1) 酵素標識抗体に二糖類以上の非還元糖類及び糖アルコールから選ばれる1種又は2種以上を添加することを特徴とする酵素標識抗体の安定化法。

(2) 酵素標識抗体は、マレイミド導入ペルオキシダーゼと抗体 F(ab')₂ とが結合した酵素標識抗体である特許請求の範囲第(1)項記載の酵素標識抗体の安定化法。

3. 発明の詳細な説明

本発明は酵素標識抗体の安定化法に関し、更に詳しくは酵素標識抗体を凍結乾燥品などの製剤状態で、長期間に亘って安定化することができる方法に関する。

従来より免疫学的手法を用いて抗原抗体反応によって生体液中の様々な物質を測定することが行われてきた。この様な手法には、例えば毛細管

沈降法、免疫比濁法、ネフエロメリックイムノアッセイ、ラテックス凝集法、ラジオイムノアッセイ等の測定法が利用されている。ところが、これらの測定法は、測定感度が適当でなかったり、操作が煩雑であったり、放射性物質の処理等に問題があるなど、通常の臨床検査において不都合を来している。そこで、近年になってエンザイムイムノアッセイの如く抗原又は抗体に酵素を標識し、これによって微量成分を正確に測定する方法が開発され盛んに利用されている。また、特願昭57-3314号明細書には、酵素を標識した抗原あるいは抗体を用いて抗原抗体反応を行なわせ、会合の結果生ずる酵素活性の変化を光学的に測定し、目的の抗原あるいは抗体を定量する均一系の分析方法が記載されており、非常に簡便且つ正確な方法であるため、日常的な臨床検査への利用が期待されている。ところが、酵素を標識した抗体は、粉末及び凍結乾燥品などの製剤としての長期の安定性に問題があり、実用の妨けとなっていることから、長期保存状態においても酵素活性が低下する

様なことのない酵素標識抗体を開発することが強く望まれていた。

本発明は、この様な実情に鑑みてなされたものであり、その目的とするところは、製造時から使用時に亘る長期保存状態においても酵素活性の低下が極めて少ないものとなる、酵素標識抗体の安定化法を提供することにある。

即ち、本発明の酵素標識抗体の安定化法は、酵素標識抗体に二糖類以上の非還元糖類及び糖アルコールから選ばれる1種又は2種以上を添加することを特徴とするものである。

本発明に使用する酵素標識抗体は、抗 α -フェトプロテイン(AFP)、抗IgE、抗D-フルクトース-1,6-二磷酸(抗FDP)、抗フェリチン、抗カーシノーマエムブリオニックアンチゲン、抗 β_2 マイクログロブリン等の抗体をペルオキシダーゼ、アルカリ性フォスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、グルコamilラーゼ、アセチルコリンエステラーゼ、マラテヒドロゲナーゼ等の酵素で標識したものである。

用する前記緩衝液はリン酸緩衝液又はトリス緩衝液であることが好ましいが、これらに限定されない。

本発明で使用する二糖類以上の非還元糖類及び糖アルコールとしては、シュクロース、トレハロース、ツラノース、ラフィノース、メレチトース等の少糖類、デキストラン等の多糖類などの糖類、フィコール400(商品名、ファルマシア・ファインケミカル社製;シュクロースと、エピクロルヒドリンとの分岐を有する反応生成物;分子量40万)等の糖誘導体、及びイノシトール、マンニトール、ソルビトール等の糖アルコールが挙げられる。これらの糖類及び糖アルコールの使用量は、製剤原液に対して、一般に、1重量%以上で十分な効果が得られる。また、シュクロースを例にとれば、2.5重量%以上の添加で更に良好な結果が得られる。

本発明によれば、酵素標識抗体製剤の安定化に極めて甚大な効果が奏されるが、とりわけ凍結乾燥品を得るなど製剤時の安定化、ならびに、凍結

酵素標識抗体の調製には公知の試薬が使用できる。たとえば、グルタルアルデヒド、カルボジイミド、ビスマレイミド、2個の異なる官能基を有する試薬等があり、また、ペルオキシダーゼの糖鎖を過沃素酸で酸化してアルデヒド基にする方法も有効である。これらの試薬を用い抗体の反応性を保った状態で酵素を標識する。

本発明で使用する酵素標識抗体として特に好ましくは、マレイミド導入ペルオキシダーゼと $F(ab')_2$ とが結合した酵素標識抗体である。抗体 $F(ab')_2$ 画分の調製は、公知の方法により、例えば抗FDP、抗IgE等をペプシン消化するなどして得られる。

酵素標識抗体は、通常、リン酸緩衝液、トリス緩衝液等のpH6.5~8.0の適宜の緩衝液と混合され液状(以下、製剤原液という)にした後、常法に従って、凍結乾燥、噴霧乾燥などにより粉粒状製剤とされる。この場合、本発明で使用する二糖類以上の非還元糖類及び糖アルコールから選ばれる1種又は2種以上は、前記緩衝液との混合時に酵素標識抗体に添加されるのが好適である。なお、使

乾燥品などの製剤としての長期に亘る安定化に良好なる結果をもたらす。

以下に示す試験例により、本発明を更に詳しく説明する。

試験例1 α -フェトプロテイン(AFP)の測定における各種安定化剤の効果

特願昭57-3314号明細書に記載された方法に基づき、酵素標識抗体の調製、並びにAFPの測定を行なった。

a) 抗AFP抗体 $F(ab')_2$ 画分の調製:

西等の方法(Cancer Res., 30, 2507~2513, 1970)により臍帯血清より抽出し精製したAFPをフロイントの完全アジュバントと等量混合し、ウサギに免疫して抗AFPウサギ血清を得た。この抗血清よりエベレイ等の方法(J. Solid-phase Biochem., 2, 45~78, 1977)によって抗体を精製した。0.1M酢酸緩衝液(pH4.5)に対して透析した抗体に2%重量のペプシン(ベーリンガー社製品)を加え37℃において48時間消化した後、セファデックス

G-200 カラムを用いて抗 AFP 抗体 $F(ab')_2$ 画分を得た。

b) マレイミド基導入 HRP の調製：

ナカネ等の方法 (The J. of Histochem. & Cytochem., 22-12, 1084~1091, 1974) に準じ、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) 9 ㎎とテトラメチレンジアミン 1.5 ㎎を結合させ、アミノ基を導入した HRP を得た。このアミノ基導入 HRP 2.3 ㎎に北川らの方法 (臨床化学, 6 巻, 3 号, 178-186, 1978) によりメタマレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (ピアスケミカル社製品) 1.8 ㎎を加え 37℃において 30 分間反応させた後、セファデックス G-25 カラムを用いて分画しマレイミド基を導入した HRP を得た。

c) 酵素標識抗体の調製：

a) で調製した抗体 $F(ab')_2$ に最終濃度 125 mM の 2-メルカプトエチルアミンを加え 90 分間反応後セファデックス G-25 カラムを用いて分画して得られた抗体 Fab' 6 ㎎に実施例 2-b)。

で調製したマレイミド基導入 HRP 1.5 ㎎を加え 37℃において 30 分間反応後、室温で一夜静置した。これをセファデックス G-200 カラムを用いて分画し酵素標識抗体を得た。

d) AFP の測定：

リン酸緩衝液 (pH 7.0) で調製した AFP 希釈系列より 0.05 ml、6% ポリエチレングリコール + 6000 のリン酸緩衝液より 0.05 ml、並びに c) の酵素標識抗体 0.05 ml をそれぞれ試験管にとり、37℃において 20 分間反応させた後、0.75 mM 4-アミノアンチピリン、25 mM フェノール 10 mM 過酸化水素からなる基質呈色液 0.5 ml を加え 37℃10 分間反応後、反応停止液 2.0 ml を加え反応を停止した後、波長 500 nm における吸光度を測定する。

上記測定法を用いて以下の如く調製した凍結乾燥品の安定性を調べた。

403 nm の吸光度 0.025 となる AFP-酵素標識抗体に表-1 に示した 0.5~5% の各種安定化剤と 2.5% 牛血清アルブミンと 20 mM の各種緩衝液

を含有する原液を調製しその 1 ml を 10 ml バイアル瓶に分注し凍結乾燥を行った。

AFP 測定時には生理食塩水 2.5 ml にて 1 バイアルを溶解しその 0.02 ml を上記測定時に用いた。

表-1 に各種条件での凍結乾燥直後と 37℃にて 1 ヶ月間保存した酵素標識抗体の AFP 測定時の AFP 希釈系列の吸光度を各々、原液、凍結乾燥直後を 100% として残存活性 (%) であらわした。

安定剤を添加した場合においては凍結乾燥時の低下及び長期保存に対して著明な効果が見受けられた。

	瓶	20 mM Buffer. pH	添 加 物	凍結乾燥直後 (原液 100%)			37℃1ヶ月 (凍結乾燥直後を100%)		
				AFP 100 ng/ml	200 ng/ml	400 ng/ml	AFP 100 ng/ml	200 ng/ml	400 ng/ml
実 施 例	1	リン酸 8.0	-	8 2.5	8 5.3	8 4.8	3 3.6	3 8.8	3 9.5
	2	"	5 % シュークロース	9 7.1	9 6.6	9 4.8	8 4.3	9 1.3	8 9.6
	3	"	5 % トレハロース	8 5.5	9 1.2	8 9.4	8 0.5	7 8.7	8 1.4
	4	"	5 % ラフィノース	8 5.0	8 9.1	8 6.6	7 5.6	7 9.7	8 1.0
	5	"	5 % マンニトール	9 1.0	9 3.8	9 1.4	4 8.8	5 2.7	5 3.9
	6	"	5 % イノシトール	8 9.6	8 9.8	8 8.0	7 4.4	7 4.9	7 5.4
	7	"	5 % フィコール 400	7 8.3	8 3.8	8 2.6	5 5.6	5 6.3	5 7.1
	8	トリス 8.0	5 % シュークロース	9 6.4	9 6.3	9 4.3	8 5.2	8 8.4	8 5.8
	9	リン酸 8.0	5 % シュークロース BSA 無添加	9 8.5	9 9.6	9 8.3	9 2.6	9 0.2	8 8.5
比 較 例	10	"	5 % ラクトース	8 4.8	8 7.9	8 4.3	4 9.1	5 3.8	5 6.1
	11	"	0.5 % (K=90) ポリビニルピロリドン	5 5.2	6 4.1	6 2.4	1 4.9	1 6.8	1 6.8
	12	"	1 % (K=205) ポリビニルアルコール	7 6.0	7 7.4	7 6.5	3 5.1	3 9.3	3 9.5
	13	"	5 % リジン	8 2.4	8 2.8	8 1.8	6.7	1 1.7	1 2.9
	14	"	5 % アルギニン	7 8.4	8 2.1	7 8.8	1 4.3	1 7.7	1 9.9
	15	"	5 % アスパラギン酸	7 3.0	7 9.1	7 9.0	1 9.1	2 2.3	2 3.9
	16	"	5 % グルタミン酸	7 6.9	8 1.5	7 9.6	5 1.6	5 6.6	5 6.7

一般的に安定剤としてよく用いられる牛血清アルブミンによる安定化 (瓶 2 と瓶 9 を対比) は弱く本発明の安定化方法では極めて良好に安定化されている。またトリス緩衝液とリン酸緩衝液とによる差は見られない。

試験例 2. pH 及び二種混合による影響

試験例 1 の酵素標識抗体を用い各種化合物、及び安定剤を添加し、20 mM の各種緩衝液にて pH を変化した原液を調製しその 1 ml を 10 ml バイアル瓶に分注し凍結乾燥を行った。

37℃1ヶ月間の保存安定性を試験例 1. と同様に AFP 測定時の AFP 希釈系列の吸光度を凍結乾燥直後を 100 % として残存活性 (%) で表 - 2 に示した。

pH 変化による影響は極めて少く、安定化剤の二種混合においても極めて良好な保存性が得られた。還元糖との組合せでは還元糖の影響を受け若干安定性が不良であった。安定化剤無添加の場合では残存活性は殆ど無くなっている。

試験例 3. 安定化剤の濃度と安定性

試験例 1 の酵素標識抗体を用い安定化剤の濃度を変化させた 20 mM トリス緩衝液 pH 7.5 を含む原液を調製しその 1 ml を 10 ml バイアル瓶に分注し凍結乾燥を行った。

図 - 1 に 37℃1ヶ月間の残存活性 (%) (AFP 濃度 800 ng/ml で曲線 1、100 ng/ml で曲線 2) を試験例 1 と同様に AFP 測定時の AFP 希釈系列の吸光度を凍結乾燥直後の吸光度を 100 % として表した。安定化剤として好ましくは 2.5 % 以上あれば良いことが判る。

表 - 2 残 存 活 性 (%)

No	緩衝液・pH	添 加 物	37℃ 1ヶ月 (凍結乾燥直後を100%)		
			AFP 100 ng/μl	200 ng/μl	400 ng/μl
1	リン酸・6.5	5% シュクロース	98.4	98.7	97.8
2	リン酸・7.0	"	103.4	99.7	96.7
3	リン酸・8.0	"	89.5	90.2	95.5
4	トリス・7.5	"	92.1	91.9	92.6
5	"	5% シュクロース 5 mM EDTA	95.1	94.8	98.7
6	"	5% シュクロース 5% ラクトース	56.6	56.5	64.6
7	"	5% シュクロース 5% マルトース	62.6	62.6	71.8
8	"	5% シュクロース 5% ラフィノース	84.5	83.6	90.9
9	"	5% シュクロース 2% フィコール400	97.2	91.3	94.0
10	"	-	1.0	0.7	1.3

曲線 1 ... AFP 濃度 800 ng/μl

曲線 2 ... AFP 濃度 100 ng/μl

4. 図面の簡単な説明

図面は、本発明方法により安定化した酵素標識抗体の安定化剤濃度による活性安定化の変化を示した図である。

